

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-187669

(P2004-187669A)

(43) 公開日 平成16年7月8日(2004.7.8)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/09
C 1 1 D 3/386
C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 1 D 3/386
C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21

4 B O 2 4
4 B O 5 0
4 B O 6 5
4 H O O 3

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-122430 (P2003-122430)
(22) 出願日 平成15年4月25日 (2003.4.25)
(31) 優先権主張番号 特願2002-186387 (P2002-186387)
(32) 優先日 平成14年6月26日 (2002.6.26)
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)
(31) 優先権主張番号 特願2002-304232 (P2002-304232)
(32) 優先日 平成14年10月18日 (2002.10.18)
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 000000918
花王株式会社
東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1
〇号
(74) 代理人 110000084
特許業務法人アルガ特許事務所
(74) 代理人 100068700
弁理士 有賀 三幸
(74) 代理人 100077562
弁理士 高野 登志雄
(74) 代理人 100096736
弁理士 中嶋 俊夫
(74) 代理人 100101317
弁理士 的場 ひろみ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルカリプロテアーゼ

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 特定のアルカリプロテアーゼについて、その分泌能を高める技術を提供する。

【解決手段】 プレプロ配列を有するアルカリプロテアーゼであって、当該プレプロ配列が、特定のアミノ酸配列又はこれと80%以上の相同性を有する配列において、当該特定のアミノ酸配列の(a)52位、(b)75位、(c)142位又はこれらに相当する位置のアミノ酸残基が、下記アミノ酸残基； (a)位置：アスパラギン酸、アルギニン (b)位置：アラニン、アルギニン (c)位置：リジンに置換された変異プレプロ配列であり、成熟酵素としては、上記特定のアミノ酸配列又はこれと80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるアルカリプロテアーゼ；これをコードする遺伝子。遺伝子を含有するベクター、形質転換体などを提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プレプロ配列を有するアルカリプロテアーゼであって、当該プレプロ配列が、配列番号 1 に示すアミノ酸配列又はこれと 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列において、当該配列番号 1 の (a) 52 位、(b) 75 位、(c) 142 位又はこれらに相当する位置のアミノ酸残基が、下記アミノ酸残基；

(a) 位置：アスパラギン酸、アルギニン

(b) 位置：アラニン、アルギニン

(c) 位置：リジン

に置換された変異プレプロ配列であり、成熟酵素として配列番号 2 に示すアミノ酸配列又はこれと 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるアルカリプロテアーゼ。

10

【請求項 2】

請求項 1 記載のアルカリプロテアーゼをコードする遺伝子。

【請求項 3】

請求項 2 記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

【請求項 4】

請求項 3 記載のベクターを含有する形質転換体。

【請求項 5】

宿主が微生物である請求項 4 記載の形質転換体。

【請求項 6】

請求項 1 記載の変異プレプロ配列をコードする遺伝子。

20

【請求項 7】

請求項 5 記載の形質転換体を用いることを特徴とする配列番号 2 に示すアミノ酸配列又はこれと 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるアルカリプロテアーゼの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は洗浄剤配合酵素として有用なアルカリプロテアーゼに関する。

【0002】

30

【従来技術及び発明が解決しようとする課題】

産業分野で最も生産量の多いアルカリプロテアーゼは衣料用洗剤等の洗浄剤に配合される洗剤用プロテアーゼであり、例えば、アルカラーゼ（登録商標；ノボザイムズ社）、サビナーゼ（登録商標；ノボザイムズ社）、マクサカル（登録商標；ジェネンコア社）、ブラップ（登録商標；ヘンケル社）、及び KAP（花王）等が知られている。

【0003】

衣料用洗剤にプロテアーゼを配合する目的は、衣料に付着したタンパク質汚れを分解することであるが、実際の汚れはタンパク質だけでなく皮脂由来の脂質や泥、埃汚れ等、有機物と無機物が入り混じった複数の成分からなる複合汚れであり、このような複合汚れに対する洗浄性の高い洗浄剤が望まれていた。

40

【0004】

かかる観点から本発明者らは、高濃度の脂肪酸存在下でも十分なカゼイン分解活性を保持し、タンパク質だけでなく皮脂等の混在する複合汚れに対しても優れた洗浄性を有する分子量約 43,000 のアルカリプロテアーゼを数種見出し、先に特許出願した（例えば、特許文献 1 参照）。そして、これらのアルカリプロテアーゼ群は、その分子量、一次構造、酵素学的性質、特に非常に強い酸化剤耐性を有する点で、従来から知られているバチルス属細菌由来のセリンプロテアーゼであるズブチリシンとは異なり、新しいズブチリシンサブファミリーに分類することが提唱されている（例えば、非特許文献 1 参照）。

【0005】

しかしながら、このようなプロテアーゼであっても、工業的レベルでの生産を考えた場合

50

、その生産量は十分な量とは言えず、培地中に効率良く分泌されるアルカリプロテアーゼが求められていた。

【0006】

一方、目的のタンパク質（酵素）を多量に分泌させる試みとしては、宿主菌（生産菌）の変異育種による改良、酵素をコードする遺伝子あるいはその制御を行う遺伝子を改変して分泌量をもつ方法が知られているが、ズブチリシンについては分泌とフォールディングに重要な働きを担うプレプロ配列を改変し酵素の分泌量をもつという試みは為されていない。

【0007】

本発明は特定のアルカリプロテアーゼについて、その分泌能をもつ技術を提供すること

10

【0008】

【特許文献1】

国際公開第99/18218号パンフレット

【非特許文献1】

Saekiら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 279, (2000), 313-319

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前記アルカリプロテアーゼの特性を保持しつつ、効率良く培地中に分泌できる新たな酵素の探索を行ったところ、当該アルカリプロテアーゼのプレプロ配列中の特定位置のアミノ酸残基を特定のアミノ酸残基に変異させた場合に、当該アルカリプロテアーゼの生産性を向上できることを見出した。

20

【0010】

すなわち本発明は、プレプロ配列を有するアルカリプロテアーゼであつて、当該プレプロ配列が、配列番号1に示すアミノ酸配列又はこれと80%以上の相同性を有するアミノ酸配列において、当該配列番号1の(a)52位、(b)75位、(c)142位又はこれらに相当する位置のアミノ酸残基が、下記アミノ酸残基；

(a)位置：アスパラギン酸、アルギニン

(b)位置：アラニン、アルギニン

30

(c)位置：リジン

に置換された変異プレプロ配列であり、成熟酵素として配列番号2に示すアミノ酸配列又はこれと80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるアルカリプロテアーゼ、当該アルカリプロテアーゼをコードする構造遺伝子、該構造遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む形質転換体を提供するものである。

【0011】

また本発明は、上記変異プレプロ配列をコードする遺伝子を提供するものである。

【0012】

更に本発明は、上記形質転換体を用いることを特徴とする配列番号2に示すアミノ酸配列又はこれと80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるアルカリプロテアーゼの製造法を提供するものである。

40

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明のアルカリプロテアーゼにおけるプレプロ配列（「変異プレプロ配列」ともいう）は、配列番号1に示すアミノ酸配列又はこれと80%以上の相同性を有するアミノ酸配列の(a)52位、(b)75位、(c)142位又はこれらに相当する位置のアミノ酸残基を(a)位置：アスパラギン酸、アルギニン、(b)位置：アラニン、アルギニン、(c)位置：リジン、に置換してなるものである。本発明のプレプロ配列は、野生型の変異体或いは人為的に変異を施した変異体であってもよい。

【0014】

50

ここでプレプロ配列とは、アルカリプロテアーゼの分泌、フォールディングに關与する重要な領域であり、プレ配列はシグナル配列であり、アルカリプロテアーゼ前駆体が細胞膜を通過する際にシグナルペプチダーゼにより切断される。また、プロ配列は、分子内シャペロニンとして作用することが知られており、細胞膜の通過前後においてアルカリプロテアーゼが正確な立体構造をとるために必須の領域である。プロ配列は最終的に成熟型のアルカリプロテアーゼにより切断されさらに小さなペプチドへと分解される。即ち、アルカリプロテアーゼをコードする構造遺伝子から転写、翻訳される産物はプレプロ配列を有するアルカリプロテアーゼ前駆体として細胞内に存在する。従って、本発明のプレプロ配列を有するアルカリプロテアーゼとはアルカリプロテアーゼ前駆体を示すものである。

【0015】

ここで、変異前のプレプロ配列である配列番号1に示すアミノ酸配列としては、例えばK P 4 3 [バチルス エスピー K S M - K P 4 3 (F E R M B P - 6 5 3 2) 由来、国際公開第99/18218号パンフレット]のプレプロ配列が挙げられる。

また、配列番号1に示すアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列としては、好ましくは87%以上、より好ましくは90%以上、95%以上、更に98%以上の相同性を有するものが好ましく、更に後記段落【0020】で示す性質を有するプロテアーゼのプレプロ配列であることが好ましい。具体的には、例えばプロテアーゼK P 9 8 6 0 (G e n B a n k A c c e s s i o n N o . A B 0 4 6 4 0 3) [バチルス エスピー K S M - 9 8 6 0 (F E R M B P - 6 5 3 4) 由来、国際公開第99/18218号パンフレット]、プロテアーゼK P 9 8 6 5 (G e n B a n k A c c e s s i o n N o . A B 0 8 4 1 5 5) [バチルス エスピー K S M - 9 8 6 5 (F E R M P - 1 8 5 6 6) 由来、特願2002-2653号]のプレプロ配列が挙げられ、その相同性はそれぞれ86.8%、97.6%である(図1)。

【0016】

なお、アミノ酸配列の相同性は、G E N E T Y X W I Nのマキシマムマッチングやサーチホモロジー等のプログラム(ソフトウェア開発)により計算される。

【0017】

また、「相当する位置のアミノ酸残基」を特定する方法としては、例えばリップマン-パーソン法等の公知のアルゴリズムを用いてアミノ酸配列を比較し、各アルカリプロテアーゼのアミノ酸配列中に存在する保存アミノ酸残基に最大の相同性を与えることにより行うことができる。プレプロ配列のアミノ酸配列をこのような方法で整列させることにより、アミノ酸配列中にある挿入、欠失にかかわらず、相同アミノ酸残基の各プレプロ配列における配列中の位置を決めることが可能である。相同位置は、三次元構造中で同位置に存在すると考えられ、対象のプロテアーゼの特異的機能に関して類似した効果を有することが推定できる。

【0018】

すなわち、上記の方法でアミノ酸配列を整列させた図1より、配列番号1の(a)52位、(b)75位、(c)142位のアミノ酸残基は、それぞれリジン、グルタミン及びグルタミン酸である。その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより特定することができる。例えば、プロテアーゼK P 9 8 6 0、プロテアーゼK P 9 8 6 5のプレプロ配列においても(a)52位、(b)75位、(c)142位のアミノ酸残基は、それぞれリジン、グルタミン及びグルタミン酸である。

【0019】

そして、本発明の変異プレプロ配列においては、配列番号1の(a)52位又はその位置に相当する位置のアミノ酸残基は、アスパラギン酸、アルギニンに置換されるのが好ましく、アルギニンであるのが特に好ましい。(b)75位又はその位置に相当する位置のアミノ酸残基は、アラニン、アルギニンに置換されるのが好ましく、アルギニンであるのが特に好ましい。(c)142位又はその位置に相当する位置のアミノ酸残基は、リジンに置換されるのが特に好ましい。

【0020】

また、本発明の変異プレプロ配列におけるアミノ酸残基の(a)～(c)の選択は、酵素の特性が変化しない限り2箇所以上が同時になされていてもよい。2箇所以上が同時になされた場合の具体例としてはLys 52 (Asp/Arg) + Gln 75 (Ala/Arg)、Lys 52 (Asp/Arg) + Glu 142 Lys、Lys 52 (Asp/Arg) + Glu 142 Lys、Gln 75 (Ala/Arg) + Lys 52 (Asp/Arg) + Glu 142 Lysが挙げられる。好ましい組合せとしては、Lys 52 Arg + Gln 75 Arg、Lys 52 Asp + Gln 75 Ala、Lys 52 Asp + Glu 142 Lysであり、特に好ましくは、Lys 52 Arg + Glu 142 Lysである。尚、アミノ酸は3文字表記とし、「+」は1箇所の置換に対し付加された置換を表し、「/」については表記したいずれのアミノ酸を使用しても良いことを示している。

10

【0021】

本発明のアルカリプロテアーゼは、プレプロ配列として上記の変異プレプロ配列を有し、成熟酵素として配列番号2に示すアミノ酸配列又はこれと80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるものである。

ここで、配列番号2に示すアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列としては、好ましくは87%以上、より好ましくは90%以上、更に95%以上の相同性を有するものが好ましく、野生型又は野生型の変異体であってもよい。また、その性質として酸化剤耐性を有し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)により認められる分子量が43,000±2,000であるものが好ましく、特にpH8以上のアルカリ性領域で作用する、酸化剤耐性を有する、高濃度の脂肪酸存在下において酵素活性が阻害されない、ゼラチンに対する分解活性が強い、50℃、pH10で10分間処理したとき80%以上の残存活性を示す、ジソプロピルフルオルリン酸(DFP)及びフェニルメタンスルホンフルオリド(PMSF)で阻害され、SDS-PAGEによる分子量が43,000±2,000であるものが好ましい。

20

【0022】

ここで、酸化剤耐性を有するとは、当該アルカリプロテアーゼを50mM過酸化水素、5mM塩化カルシウムを含む20mMブリットンロビンソン緩衝液(pH10)中で、30℃、20分間の放置後の残存活性が少なくとも50%以上を保持していることをいう。以上の性質を保持していれば野生型、野生型の変異体或いは人為的に変異を施したアルカリプロテアーゼであってもよい。

30

【0023】

配列番号2で示すアミノ酸配列を有するアルカリプロテアーゼ(成熟型アルカリプロテアーゼ)としては、例えば、KP43〔バチルス エスピーKSM-KP43(FERM BP-6532)由来、国際公開第99/18218号パンフレット〕が挙げられ、配列番号2に示すアミノ酸配列と80%以上の相同性をもつアミノ酸配列を有するアルカリプロテアーゼとしては、例えばプロテアーゼKP9860(GenBank Accession No. AB046403)〔バチルス エスピーKSM-9860(FERM BP-6534)由来、国際公開99/18218号パンフレット〕、プロテアーゼ9865(GenBank Accession No. AB084155)〔バチルス エスピー KSM-9865(FERM P-1592)由来、特願2002-002653〕、プロテアーゼE-1(GenBank Accession No. AB046402)〔バチルス No. D-6(FERM P-1592)由来、特開昭49-71191〕、プロテアーゼYa(GenBank Accession No. AB046404)〔バチルス エスピーY(FERM BP-1029)由来、特開昭61-280268〕、プロテアーゼSD521(GenBank Accession No. AB046405)〔バチルス SD521(FERM P-11162)由来、特開平3-191781〕、プロテアーゼA-1(GenBank Accession No. AB046406)〔NCIB12289由来、国際公開第88/01293号パンフレット01293〕、プロテアーゼA-2〔NCIB12513由来、国際公開第98/56927号パンフレット〕や、配列番号2のアミノ酸配列の46位をロイシンに置換した変

40

50

異体、57位をアラニンに置換した変異体、103位をアルギニンに置換した変異体、107位をリジンに置換した変異体、124位をそれぞれリジン及びアラニンに置換した変異体、136位をアラニンに置換した変異体、193位をアラニンに置換した変異体、195位をそれぞれアスパラギン、グルタミン酸、アルギニン、プロリン、スレオニン、バリン、ヒスチジン、セリン、リジン、グルタミン、メチオニン、システイン、アラニン、アスパラギン酸、トリプトファン、グリシン及びフェニルアラニンに置換した変異体、247位をそれぞれスレオニン及びアルギニンに置換した変異体、257位をバリンに置換した変異体、342位をアラニンに置換した変異体、66位をアスパラギン酸に置換し且つ264位をセリンに置換した二重変異体（特願2000-355166号）、配列番号2のアミノ酸配列の84位をアルギニンに置換した変異体、104位をプロリンに置換した変異体、256位をそれぞれアラニン及びセリンに置換した変異体、369位をアスパラギンに置換した変異体（特開2002-306176号公報）、配列番号2のアミノ酸配列の251位をそれぞれアスパラギン、スレオニン、イソロイシン、バリン、ロイシン及びグルタミンに置換した変異体、256位をそれぞれセリン、グルタミン、アスパラギン、バリン及びアラニンに置換した変異体（特願平2001-329472号）又はこれらとアミノ酸配列において80%以上、好ましくは87%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上の相同性を有するアルカリプロテアーゼが挙げられる。上記アルカリプロテアーゼの一部についてそのアミノ酸配列を整列させた図を示す（図2a及び図2b）。

10

【0024】

本発明に用いるアルカリプロテアーゼをコードする遺伝子のクローニングはショットガンクローニング法やPCR法等を用いればよい。また、クローニングされた遺伝子に対して変異を施してもよい。このようにして取得された遺伝子の塩基配列の一例を配列番号3に示した。また、配列番号1に示すプレプロ配列又はこれと80%以上の相同性を有するプレプロ配列の領域をコードする遺伝子もPCR法等を用いることでクローニングすることができる。

20

【0025】

プレプロ配列をコードする遺伝子の変異手段としては、一般的に行われているランダム変異や部異特異的変異の方法がいずれも採用できる。より具体的には、例えばSite-Directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Kmキット（Takara）等を用いて行うことができる。

30

【0026】

得られた変異プレプロ遺伝子を用いた本発明プロテアーゼの生産方法としては、配列番号3で示されるアルカリプロテアーゼのプレプロ配列をコードする遺伝子に変異を施した場合にはそのまま、変異プレプロ遺伝子の下流に配列番号2に示すアミノ酸配列と80%以上の相同性を有する成熟酵素をコードする遺伝子を連結する場合には、適当な制限酵素切断部位を部位特異的変異法により付与するか又はリコンビナントPCR法等を用いることにより構造遺伝子を作製すればよい。さらに当該変異遺伝子をベクターに導入し、当該プラスミドベクターが安定に増幅、保持できる宿主菌を形質転換する、或いは当該変異遺伝子を安定に維持できる宿主菌の染色体DNA上に導入させる、等の方法が採用できる。この条件を満たす宿主としては例えばバチルス属細菌、大腸菌、カビ、酵母、放線菌等が挙げられ、これらの菌株を用い、資化性の炭素源、窒素源その他必須栄養素を含む培地に接種し、常法に従い培養すればよい。

40

【0027】

斯くして、菌体内において発現される本発明のプレプロ配列を有するアルカリプロテアーゼは、形質転換体からの分泌能が高い。

【0028】

ここで、「分泌能が高い」とは、例えば変異させる前のアルカリプロテアーゼと同一の条件下において（例えばポリペプトン8%（w/v）、酵母エキス0.3%、マルトース10%、硫酸マグネシウム7水和物0.04%、リン酸2水素カリウム0.2%、無水炭

50

酸ナトリウム 1.5 %、テトラサイクリン 30 ppm から成る培地に植菌し、30℃、3日間振盪培養する)、生産したアルカリプロテアーゼ変異体について培養上清中のプロテアーゼ活性量、タンパク質量を測定した場合、一定量以上の活性量又はタンパク質量を示すことをいい、例えば親アルカリプロテアーゼの5%以上、望ましくは10%以上、さらに望ましくは15%以上の活性量又はタンパク質量の増大が認められることを意味する。特に、比活性等の変化が認められなければ、活性量又はタンパク質量のどちらか一方を測定しても構わない。

【0029】

成熟酵素は、当該アルカリプロテアーゼからプレプロ配列が切断されて菌体外に分泌生産されるが、斯かる酵素の採取及び精製は、一般の酵素の採取及び精製方法準じて行えばよい。例えば、培養液を遠心分離、又は濾過することで菌体を除き、培養上清液から常法の精製手段により目的酵素を得ることができる。このようにして得られる酵素液は、そのまま用いることもできるが、更に公知の方法により精製、結晶化、粉末化、又は顆粒化することもできる。

【0030】

斯くして得られたアルカリプロテアーゼは、酸化剤耐性を有し、高濃度の脂肪酸によるカゼイン分解活性の阻害を受けず、ゼラチン分解力が高い。SDS-PAGEにより認められる分子量が43,000±2,000であり、アルカリ性域で活性を有するという優れた性質を有し、衣料洗剤、漂白剤、硬質表面洗浄用洗剤、排水管洗剤、義歯洗剤、医療器具用の殺菌洗剤等として使用することができる。

【0031】

【実施例】

実施例1

バチルス エスピー K S M - K P 43 株由来のアルカリプロテアーゼ構造遺伝子(配列番号3)の終始コドンまでを含む約2.0 kbの範囲に対しランダム変異を与えた。まず、p K F 18 K (Takara)のマルチクローニングサイトに導入した上記約2.0 kbのDNAを増幅できるBcaBEST Sequencing Primer RV-M (Takara)及びBcaBEST Sequencing Primer M13-47 (Takara)を用いPCRを行った。反応系は、鋳型DNA 30 ng、各プライマーを20 pmol、各dNTPを20 nmol、適当量の硫酸マンガンとジメチルスルフォキシド、Takara Taq添付反応バッファー10 µL、及びTaqポリメラーゼ2.5 Uとした(全量100 µL)。PCR条件は94℃で1分間、55℃で2分間、72℃で3分間を1サイクルとし、これを30サイクル行い、最後は72℃で10分間恒温した。PCR産物をHigh Pure PCR Product Purification キット(ロッシュ)にて精製し、100 µLの滅菌水で溶出した。得られた約2.0 kbのDNA断片を、BamHI、XbaI(ロッシュ)により切断した後、同酵素にて処理しておいたp K F 18 kを混合し、DNA Ligation キット ver. 2 (Takara)により結合反応を行った。反応液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、カナマイシン(100 µg/mL)を含むLB寒天培地上にて生育させた。得られた形質転換株をカナマイシン(100 µg/mL)含有LB培地に植菌し、30℃で振盪培養した。培養上清について合成基質(Glu-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA、ペプチド研究所)を用いた活性測定を行い、親アルカリプロテアーゼの活性に比べ活性値の高い培養液を選抜し、少量の菌体並びにBcaBEST Sequencing Primer RV-M及びBcaBEST Sequencing Primer M13-47を用い、上記同条件でPCRを行ない変異遺伝子を増幅した。増幅断片を精製し、適当なプライマーとBig Dye DNA Sequencing キット(アプライドバイオシステム)を用いて、DNA Sequencer 377型(アプライドバイオシステム)にて塩基配列を決定した。

【0032】

その結果、プロテアーゼ活性が向上した変異体は配列番号1の52位のリジンがアルギニ

10

20

30

40

50

ンに、75位のグルタミンがアルギニンに、142位のグルタミン酸がリジンにそれぞれ置き換わった各変異遺伝子であることが判明し、これにより2～10%のプロテアーゼ活性の向上が認められた。次にそれぞれの変異点に関し、他のアミノ酸への置換による効果を調べる目的で変異を行った。変異の手段としては、Site-Directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Kmキット (Takara) を用い、52位、75位、142位のアミノ酸を任意のアミノ酸に置換した。鋳型プラスミド (pKF18kのBamHI、XbaIサイトにプロテアーゼ構造遺伝子を導入したプラスミド) 30ng、キット添付セレクションプライマー、プライマー3～5 (配列番号4～6) を各々20pmol及びTakara LA Taqを用いPCRを行った。反応条件は94℃で1分間、55℃で2分間、72℃で3分間を1サイクルとし、これを30サイクル行った。得られたPCR断片を精製してこれをプライマーとし、鋳型プラスミド30ngとLA Taqを用いて再度PCRを行った。反応条件は94℃で1分間、55℃で2分間、72℃で4分間を1サイクルとし、これを30サイクル行った。得られたPCR産物を精製し、ライゲーション反応を行った後、大腸菌MV1184株を形質転換した。形質転換株からプラスミドDNAを抽出し、大腸菌HB101株を形質転換した。この形質転換株をカナマイシン (100μg/mL) 含有LB培地に植菌し、30℃で振盪培養した。培養上清について合成基質を用いた活性測定を行い、親アルカリプロテアーゼの活性に比べ活性値の高い培養液を選抜した。菌体を鋳型としてPCRを行うことで変異遺伝子を増幅し、精製後、塩基配列を決定した。その結果、52位のリジンがアスパラギン酸に置換した変異体、75位のグルタミンがアラニンに置換した変異体が親アルカリプロテアーゼよりも5%、10%それぞれ活性値の増加を示すものとして取得された。142位についてはリジン以外のアミノ酸には効果が認められなかった。

【0033】

更に、上記変異部位を組み合わせることにより、プロテアーゼ活性の向上を検討した。52位の変異部位を含むBamHI-XhoI断片、142位の変異部位を含むXhoI-AatII断片、成熟酵素をコードする遺伝子を含むAatII-XbaI断片を調製し、BamHI、XbaI処理しておいたpKF18kを混合し、ライゲーション反応を行った。得られたプラスミドDNAを用いて大腸菌HB101株を形質転換し、Lys52Argの変異点にさらにGlu142Lysの変異が加わった2重変異体を取得した。培養の結果、Lys52Arg+Glu142Lys変異体はLys52Arg変異体に比べ10%の活性増加が認められた。

【0034】

実施例2

以上のように取得された各変異プレプロ配列は、KP43プロテアーゼを親アルカリプロテアーゼとした場合は、上記の様に活性増加に効果のあることが明らかになった。そこで既に分泌能力や比活性の向上している変異アルカリプロテアーゼ (配列番号2においてPhe46Leu/Thr65Pro/Tyr195Gly/Val273Ile/Thr359Ser/Asp369Asn/Ser387Alaに置換されたアルカリプロテアーゼKP43H) に対し、本発明のプレプロ配列が効果を示すか否かの検討を加えた。

【0035】

各変異プレプロ配列をコードする遺伝子断片をpKF18kよりBamHIとAatIIにて切りだし、同様にAatIIとXbaIにより切り出されたKP43Hをコードする遺伝子をリガーゼにより結合させた (AatIIサイトはコードされるアミノ酸を変化させることなく部位特異的に塩基を置換して新たに作製した)。取得したプラスミドを用いて大腸菌HB101株を形質転換した。各プラスミドを抽出した後、BamHIとXbaIにより切断した。得られた断片を予め同酵素にて処理しておいたpH6.4に導入し、SSH-10 (島津製作所) 及びジーンパルサーキューベット (バイオラッド) を用いたエレクトロポレーション法によりバチルス エスピー KSM-KP43株を形質転換した。スキムミルク含有アルカリ寒天培地 [スキムミルク (ディフコ) 1% (w/v)、バク

10

20

30

40

50

トリプトン（ディフコ）１％、酵母エキス（ディフコ）０．５％、塩化ナトリウム０．５％、寒天１．５％、無水炭酸ナトリウム０．０５％、テトラサイクリン１５ppm]上に生育してきた形質転換株のスチームミルク溶解斑の形成状況により、プロテアーゼ遺伝子導入の有無を判定した。プロテアーゼ遺伝子がpHA64に挿入されたプラスミドを保持している形質転換株を選抜し、以後の培養に供した。

【００３６】

各形質転換株について単集落分離、ハロー形成の確認を行い、試験管中の５mL種母培地〔ポリペプトンＳ（日本製薬）６．０％（w/v）、酵母エキス０．１％、マルトース１．０％、硫酸マグネシウム７水和物０．０２％、リン酸２水素カリウム０．１％、無水炭酸ナトリウム０．３％、テトラサイクリン３０ppm〕に植菌し、３０℃、３２０rpmで一晩前培養した。この種母培養液を５００mL容坂口フラスコ中の２０mL主培地〔ポリペプトンＳ８％（w/v）、酵母エキス０．３％、マルトース１０％、硫酸マグネシウム７水和物０．０４％、リン酸２水素カリウム０．２％、無水炭酸ナトリウム１．５％、テトラサイクリン３０ppm〕に１％植菌（v/v）し、３０℃、１２１rpmで３日間培養した。得られた培養液を遠心分離し、培養上清中のプロテアーゼ活性を測定した。プロテアーゼ活性はカゼイン法により、タンパク質量はプロテインアッセイキット（和光純薬）を用いて測定した。その結果、変異ブレブ配列を有するアルカリプロテアーゼKP43Hの培養活性はコントロール（アルカリプロテアーゼKP43H遺伝子を有する形質転換株を同条件で培養したもの）のそれに比べ５～２５％向上した（表１）。また、選抜された形質転換株からプラスミドを回収し、塩基配列を決定し、目的の変異体であることを確認した。

【００３７】

上記変異部位により得られるアルカリプロテアーゼは、形質転換株での酵素の分泌を向上させる以外は親アルカリプロテアーゼの特性、すなわち、酸化剤耐性を有し、ゼラチンに対し高い分解活性を示し、高濃度の脂肪酸によるカゼイン分解活性の阻害を受けず、SDS-PAGEにより認められる分子量が４３，０００±２，０００であり、アルカリ性域で活性を有する性質を保持していることを確認した。

【００３８】

〔プロテアーゼ活性測定法－合成基質法〕

合成基質（G l t - A l a - A l a - P r o - L e u - p N A : A A P L）を用いた酵素活性は、９６穴アッセイプレート（イワキ）内に１００mM ホウ酸緩衝液（pH10.5）４８．５μL、１００mM A A P L １．５μLからなる反応液に適当に希釈した酵素液又は培養液を５０μL加え、i E M SリーダーMS（L A B S Y S T E M S）を使用し３０℃で１５分間反応を行った。遊離されるパラニトロアニリンを４１４nmの吸光度を測定した。酵素１unitは、上記反応条件下において１分間に０．００１の吸光度を上昇させる量とした。

【００３９】

〔プロテアーゼ活性測定法－カゼイン法〕

カゼイン１％（w/v）を含む５０mMホウ酸緩衝液（pH10.5）１．０mLを３０℃で５分間保温した後、０．１mLの酵素溶液を加え、１５分間反応を行う。反応停止液（０．１１Mトリクロロ酢酸－０．２２M酢酸ナトリウム－０．３３M酢酸）を２．０mL加え、室温で３０分間放置した後、濾過を行い、濾液中の酸可溶性タンパク質をLowryらの方法の変法により定量した。すなわち、０．５mLの濾液にアルカリ性銅溶液（１％酒石酸ナトリウム・カリウム：１％硫酸銅・５水和物：２％炭酸ナトリウム・０．１N水酸化ナトリウム＝１：１：１００）を２．５mL加え、室温で１０分間放置後、フェノール溶液〔フェノール試薬（関東化学）を蒸留水にて２倍希釈したもの〕を０．２５mL添加し、３０℃で３０分間保温した。その後、６６０nmにおける吸光度を測定した。プロテアーゼ１単位（１PU）は、上記反応条件で１分間に１mmolのチロシンに相当する酸可溶性タンパク質分解物を遊離させるのに必要な酵素量とした。

【００４０】

10

20

30

40

50

【表 1】

変異体	相対活性 (%)
KP43H (コントロール)	100
Lys52Asp	105
Lys52Arg	119
Gln75Ala	110
Gln75Arg	110
Glu142Lys	107
Lys52Arg/Glu142Lys	125

10

【0041】

実施例 2

(1) 洗剤の調製

20 攪拌翼を有した 1 m³ の混合槽に水 465 kg を加え、水温が 55℃ に達した後に 40% (w/v) ポリアクリル酸ナトリウム水溶液 135 kg を添加した。15 分間攪拌した後に、炭酸ナトリウム 120 kg、硫酸ナトリウム 60 kg、亜硫酸ナトリウム 9 kg、蛍光染料 3 kg を添加した。更に 15 分間攪拌した後に、ゼオライト 300 kg を添加し、30 分間攪拌して均質なスラリーを得た (スラリー中の水分は 50 質量%)。このスラリーを噴霧乾燥塔の塔頂付近に設置した圧力噴霧ノズルから噴霧することでベース顆粒を得た (噴霧乾燥塔に供給する高温ガスは塔下部より温度が 225℃ で供給し、塔頂より 105℃ で排出)。

【0042】

30 次にレディゲミキサー (松阪技研 (株) 製、容量 20 L、ジャケット付) に上記ベース顆粒 100 質量部を投入し、主軸 (150 rpm) の攪拌下、非イオン性界面活性剤 20 質量部、直鎖アルキル (炭素数 10~13) ベンゼンスルホン酸ナトリウム 22 質量部、脂肪酸 (炭素数 14~18) ナトリウム 4 質量部、ポリエチレングリコール 2 質量部、水 4 質量部の混合液を 3 分間で投入し、その後 5 分間攪拌を行った。更にこのミキサーに結晶性ケイ酸ナトリウム 20 質量部とゼオライト 10 質量部を投入し、表面被覆を行い洗剤ベースを得た。

洗剤ベース 99 質量% に本発明プロテアーゼ粒子 0.5 質量%、及び香料 0.5 質量% を混合して最終粒状洗剤 A を得た。

【0043】

(2) 使用した原料

40 非イオン性界面活性剤: エチレンオキサイド平均付加モル数が 8.5 のエマルゲン 108 KM (花王 (株) 製)

ポリアクリル酸ナトリウム水溶液: 平均分子量 10000 (特公平 2-24283 号公報の実施例に記載の方法に従って製造した)

炭酸ナトリウム: デンス灰 (セントラル硝子 (株) 製)

ゼオライト: 平均粒径が 3.5 μm のゼオライト 4A 型 (東ソー (株) 製)

ポリエチレングリコール: K-PEG6000 (平均分子量 8500, 花王 (株) 製)

結晶性ケイ酸ナトリウム: 粉末 SKS-6 (ヘキストトクヤマ (株) 製)

本発明プロテアーゼ粒子: 表 1 記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品から特開昭 62-257990 号公報の実施例 1 に記載の方法に基づき調製した造粒物 (6PU/g)

50

蛍光染料：チノパールCBS-X（チバガイギー社製）

【0044】

実施例3

（1）洗剤の調製

まず固形分50質量%のスラリーを熱風温度250℃で噴霧乾燥し、ポリアクリル酸ナトリウム（質量平均分子量10000）7質量%、炭酸ナトリウム26質量%、硫酸ナトリウム20質量%、塩化ナトリウム6質量%、蛍光染料0.5質量%、ゼオライト40質量%、水0.5質量%のベース顆粒を得た。

次にレディゲミキサー（松阪技研（株）製、容量20L、ジャケット付）に上記ベース顆粒100質量部を投入し、主軸（150rpm）の攪拌下、非イオン性界面活性剤20質量部、直鎖アルキル（炭素数10～13）ベンゼンスルホン酸ナトリウム22質量部、脂肪酸（炭素数14～18）ナトリウム4質量部、ポリエチレングリコール2質量部、水4質量部の混合液を3分間で投入し、その後5分間攪拌を行った。更にこのミキサーに結晶性ケイ酸ナトリウム20質量部とゼオライト10質量部を投入し、表面被覆を行い洗剤ベースを得た。

洗剤ベース95質量%に漂白剤粒子2.8質量%、漂白活性剤粒子1.2質量%、本発明プロテアーゼ粒子0.5質量%、及び香料0.5質量%を混合して最終粒状洗剤Bを得た。

【0045】

（2）使用した原料

非イオン性界面活性剤：エチレンオキサイド平均付加モル数が8.5のエマルゲン108KM（花王（株）製）

ポリアクリル酸ナトリウム水溶液：平均分子量10000（特公平2-24283号公報の実施例に記載の方法に従って製造した）

炭酸ナトリウム：デンス灰（セントラル硝子（株）製）

ゼオライト：平均粒径が3.5μmのゼオライト4A型（東ソー（株）製）

ポリエチレングリコール：KPEG6000（平均分子量8500、花王（株）製）

結晶性ケイ酸ナトリウム：SKS-6（ヘキストトクヤマ（株）製）

本発明プロテアーゼ粒子：表1記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品から特開昭62-257990号公報の実施例1に記載の方法に基づき調製した造粒物（6PU/g）

蛍光染料：チノパールCBS-X（チバガイギー社製）

漂白剤粒子：炭酸ナトリウム・過酸化水素付加物（特開2000-256699号公報の段落〔0019〕記載の漂白剤粒子と同様にして得た）

漂白活性剤粒子：ラウロイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウムの造粒物（特開2000-256699号公報の段落〔0018〕記載の漂白活性剤粒子と同様にして得た）

【0046】

実施例4

表2に示す液体洗浄剤組成物（洗剤C、及び洗剤D）を調製した。

【0047】

【表2】

10

20

30

40

成分	洗剤C (質量%)	洗剤D (質量%)
非イオン性界面活性剤 ¹⁾	25.0	—
非イオン性界面活性剤 ²⁾	5.0	—
非イオン性界面活性剤 ³⁾	10.0	—
非イオン性界面活性剤 ⁴⁾	—	9.0
非イオン性界面活性剤 ⁵⁾	—	9.0
非イオン性界面活性剤 ⁶⁾	—	2.5
陰イオン性界面活性剤 ⁷⁾	1.0	—
シリコーン ⁸⁾	—	0.8
カルボン酸系ポリマー ⁹⁾	2.0	—
ポリマー ¹⁰⁾	—	0.8
クエン酸	0.2	—
塩化カルシウム	0.05	—
モノエタノールアミン	4.0	—
トリエチレングリコールフェニルエーテル	3.0	—
プロピレングリコール	3.0	—
エタノール	2.0	2.0
亜硫酸ナトリウム	0.2	—
本発明プロテアーゼ ¹¹⁾	0.5	1.0
香料	0.5	0.5
水	残部	残部
合計	100	100
使用濃度	20g/30L	40g/30L
洗浄液のpH	10.5	7.3

10

20

【0048】

1) 炭素数12～14の2級アルコール由来のアルキル基を有するポリオキシエチレン（平均7モル付加）アルキルエーテル（ソフタノール70、日本触媒化学工業製）

2) 炭素数12～14の2級アルコール由来のアルキル基を有するポリオキシエチレン（平均12モル付加）アルキルエーテル（ソフタノール120、日本触媒化学工業製）

3) 炭素数10～14の直鎖第1級アルコールにEOを平均5モル、POを平均2モル、EOを平均3モルの順にブロック付加させたもの

30

4) ポリオキシエチレンラウリルエーテル、EOを平均8モル付加させたもの

5) ポリオキシエチレンラウリルエーテル、EOを平均11.5モル付加させたもの

6) ナローレンジポリオキシエチレンアルキル（sec-C12/C13）エーテル

7) 炭素数10～14の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム

8) アミド／エーテル変性シリコーンポリマー（東レ・ダウコーニングシリコーン（株）製、BY16-906）

9) 特開平10-60476号公報の11頁6行～13行記載の方法で合成したフェノキシポリエチレングリコール、アクリル酸、マレイン酸共重合体（質量平均分子量10000、固形分51.2%）

40

10) ペンテン／マレイン酸（50／50モル比）コポリマーのナトリウム塩（質量平均分子量7000）

11) 表1記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品（15PU/g）

【0049】

実施例5

下記の表3に示す組成のうち、過炭酸ナトリウムと炭酸ナトリウム（デンス灰）を攪拌混合しながら、ポリアクリル酸ナトリウム40%水溶液、及び直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、又は非イオン性界面活性剤、又はラウロイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウムを添加した。次いで特開昭62-257990号公報の実施例1に記載の方法に基づき調製した本発明プロテアーゼ粒子を添加し、全体的に均一になる程度攪拌するこ

50

とにより、漂白剤を調製した。

【0050】

【表3】

成分	漂白剤E (質量%)	漂白剤F (質量%)
過炭酸ナトリウム ¹⁾	72.0	72.0
炭酸ナトリウム (デンス灰)	20.0	20.0
陰イオン性界面活性剤 ²⁾	2.0	—
非イオン性界面活性剤 ³⁾	—	2.0
ポリアクリル酸ナトリウム ⁴⁾	1.0	1.0
ラウロイルオキシベンゼンスルホン酸 ナトリウム	4.0	4.0
本発明プロテアーゼ ⁵⁾	1.0	1.0

10

【0051】

1) 粒径500～700 μ m

2) 炭素数12～14の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム

3) ポリオキシエチレンアルキルエーテル (アルキル基の炭素数12～14、EO平均付加モル数12)

4) 平均分子量8,000

5) 表1記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品から特開昭62-257990号公報の実施例1に記載の方法に基づき調製した造粒物 (6PU/g)

20

【0052】

実施例6

下記の表4に示す全自動食器洗浄機用洗浄剤組成物 (洗剤G、及びH) を調製した。

【0053】

【表4】

成分	洗剤G (質量%)	洗剤H (質量%)
ブルロニックL-61 ¹⁾	—	4.0
ソフタノールEP-7085 ²⁾	4.0	—
クエン酸3ナトリウム	—	30.0
トリポリリン酸ナトリウム	30.0	—
過炭酸ナトリウム	20.0	20.0
炭酸ナトリウム	20.0	20.0
非晶質珪酸塩 ³⁾	10.0	10.0
AA-MA ⁴⁾	4.0	4.0
硫酸ナトリウム	10.0	10.0
α -アミラーゼ ⁵⁾	1.0	1.0
本発明プロテアーゼ ⁶⁾	1.0	1.0

30

【0054】

1) ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体 (平均分子量2,000)

2) 炭素数12～14のsec-アルコールのエチレンオキサイド7モル、及びプロピレンオキサイド8.5モル付加物

3) JIS 2号珪酸ナトリウム

4) アクリル酸-マレイン酸共重合体

5) デュラミル60T (TM) (ノボザイムズ社製)

6) 表1記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品から特開昭62-257990号公報の実施例1に記載の方法に基づき調製した造粒物 (6PU/g)

40

【0055】

実施例7

50

下記の表 5 に示す各成分を用い、硬質表面用洗浄剤組成物（洗剤 J）を得た。

【 0 0 5 6 】

【表 5】

成分	洗剤 J（質量％）
陰イオン性界面活性剤 ¹⁾	15.0
非イオン性界面活性剤 ²⁾	5.0
非イオン性界面活性剤 ³⁾	5.0
両性界面活性剤 ⁴⁾	7.5
両性界面活性剤 ⁵⁾	4.0
クエン酸	1.0
ポリプロピレングリコール ⁶⁾	2.0
エタノール	5.0
本発明プロテアーゼ ⁷⁾	1.0
香料、水、その他／pH調整剤	54.5
合計	100.0

10

【 0 0 5 7 】

1) ポリオキシエチレン（E O P = 4）アルキル（C 1 2）エーテル硫酸エステルナトリウム

2) ポリオキシエチレン（E O P = 8）アルキル（C 1 2）エーテル

20

3) アルキル（C 1 2）ポリグルコシド（縮合度 1 . 3）

4) モノ長鎖第 3 級アルキル（C 1 2）ジメチルアミンオキシド

5) アルキル（C 1 2）ヒドロキシジメチルスルホベタイン

6) 分子量 1 0 0 0 0

7) 表 1 記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品（1 5 P U / m L）

【 0 0 5 8 】

実施例 8

前記洗剤 A（実施例 2 参照）を用いて下記表 6 記載の粒状洗剤を得た。

【 0 0 5 9 】

【表 6】

30

成分（質量％）	洗剤 K	洗剤 L	洗剤 M	洗剤 N
実施例 2 の洗剤ベース	98.4	98.3	98.5	97.2
香料	0.5	0.5	0.5	0.5
本発明プロテアーゼ ¹⁾	0.5	0.5	0.5	0.5
従来プロテアーゼ ²⁾	0.6			0.6
セルラーゼ ³⁾		0.7		0.7
リパーゼ ⁴⁾			0.5	0.5

【 0 0 6 0 】

40

1) 表 1 記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品から特開昭 6 2 - 2 5 7 9 9 0 号公報の実施例 1 に記載の方法に基づき調製した造粒物（6 P U / g）

2) 特開平 5 - 2 5 4 9 2 号公報に記載のプロテアーゼ K - 1 6 を特開昭 6 2 - 2 5 7 9 9 0 号公報の実施例 1 に記載の方法に基づき、5 P U / g としたもの

3) K A C - 5 0 0（花王（株）製）

4) リポラーゼ 1 0 0 T（T M）（ノボザイムズ社製）

【 0 0 6 1 】

【発明の効果】

本発明によれば、分泌能が向上したアルカリプロテアーゼを得ることができ、特に高濃度の脂肪酸存在下でも活性を有し、蛋白質の他に皮脂等が混在する複合汚れに対しても優れ

50

た洗浄性を有するアルカリプロテアーゼを効率良く生産できる。

【 0 0 6 2 】

SEQUENCE LISTING

<110> KAO CORPORATION

<120> Alkali protease

<130> P01701504

10

<150> JP 2002-186387

<151> 2002-06-26

<150> JP 2002-304232

<151> 2002-10-18

20

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 3.1

<210> 1

<211> 206

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-KP43

30

<400> 1

Met Arg Lys Lys Lys Lys Val Phe Leu Ser Val Leu Ser Ala Ala Ala

1

5

10

15

Ile Leu Ser Thr Val Ala Leu Ser Asn Pro Ser Ala Gly Gly Ala Arg

20

25

30

Asn Phe Asp Leu Asp Phe Lys Gly Ile Gln Thr Thr Thr Asp Ala Lys

35

40

45

40

Gly Phe Ser Lys Gln Gly Gln Thr Gly Ala Ala Ala Phe Leu Val Glu
 50 55 60
 Ser Glu Asn Val Lys Leu Pro Lys Gly Leu Gln Lys Lys Leu Glu Thr
 65 70 75 80
 Val Pro Ala Asn Asn Lys Leu His Ile Ile Gln Phe Asn Gly Pro Ile
 85 90 95
 Leu Glu Glu Thr Lys Gln Gln Leu Glu Lys Thr Gly Ala Lys Ile Leu
 100 105 110
 Asp Tyr Ile Pro Asp Tyr Ala Tyr Ile Val Glu Tyr Glu Gly Asp Val
 115 120 125
 Lys Ser Ala Thr Ser Thr Ile Glu His Val Glu Ser Val Glu Pro Tyr
 130 135 140
 Leu Pro Ile Tyr Arg Ile Asp Pro Gln Leu Phe Thr Lys Gly Ala Ser
 145 150 155 160
 Glu Leu Val Lys Ala Val Ala Leu Asp Thr Lys Gln Lys Asn Lys Glu
 165 170 175
 Val Gln Leu Arg Gly Ile Glu Gln Ile Ala Gln Phe Ala Ile Ser Asn
 180 185 190
 Asp Val Leu Tyr Ile Thr Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Val Met

10

20

30

<210> 2

<211> 434

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-KP43

<400> 2

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser
 1 5 10 15

40

Tyr Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly
 20 25 30
 Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly
 35 40 45
 Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp
 50 55 60
 Thr Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly
 65 70 75 80
 Ser Thr Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser
 85 90 95
 Ile Met Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln
 100 105 110
 Thr Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn
 115 120 125
 Ser Trp Gly Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn
 130 135 140
 Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala
 145 150 155 160
 Gly Asn Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala
 165 170 175
 Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe
 180 185 190
 Gly Ser Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg
 195 200 205
 Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly
 210 215 220
 Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe
 225 230 235 240
 Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met

10

20

30

40

245 250 255
 Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe
 260 265 270
 Val Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala
 275 280 285
 Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn
 290 295 300
 Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr
 305 310 315 320
 Val Asn Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser
 325 330 335
 Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser
 340 345 350
 Asp Ala Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu
 355 360 365
 Asp Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn Asp
 370 375 380
 Phe Thr Ser Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu
 385 390 395 400
 Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val
 405 410 415
 Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala Ile
 420 425 430
 Val Asn

10

20

30

<210> 3

<211> 1923

<212> DNA

40

<213> *Bacillus* sp. KSM-KP43

<400> 3

atg aga aag aag aaa aag gtg ttt tta tct gtt tta tca gct gca gcg 48

Met Arg Lys Lys Lys Lys Val Phe Leu Ser Val Leu Ser Ala Ala Ala

1

5

10

15

att ttg tcg act gtt gcg tta agt aat cca tct gca ggt ggt gca agg 96

Ile Leu Ser Thr Val Ala Leu Ser Asn Pro Ser Ala Gly Gly Ala Arg

20

25

30

aat ttt gat ctg gat ttc aaa gga att cag aca aca act gat gct aaa 144

Asn Phe Asp Leu Asp Phe Lys Gly Ile Gln Thr Thr Thr Asp Ala Lys

35

40

45

ggt ttc tcc aag cag ggg cag act ggt gct gct gct ttt ctg gtg gaa 192

Gly Phe Ser Lys Gln Gly Gln Thr Gly Ala Ala Ala Phe Leu Val Glu

50

55

60

tct gaa aat gtg aaa ctc cca aaa ggt ttg cag aag aag ctt gaa aca 240

Ser Glu Asn Val Lys Leu Pro Lys Gly Leu Gln Lys Lys Leu Glu Thr

65

70

75

80

gtc ccg gca aat aat aaa ctc cat att atc caa ttc aat gga cca att 288

Val Pro Ala Asn Asn Lys Leu His Ile Ile Gln Phe Asn Gly Pro Ile

85

90

95

tta gaa gaa aca aaa cag cag ctg gaa aaa aca ggg gca aag att ctc 336

Leu Glu Glu Thr Lys Gln Gln Leu Glu Lys Thr Gly Ala Lys Ile Leu

10

20

30

40

100	105	110	
gac tac ata cct gat tat gct tac att gtc gag tat gag ggc gat gtt 384			
Asp Tyr Ile Pro Asp Tyr Ala Tyr Ile Val Glu Tyr Glu Gly Asp Val			
115	120	125	
aag tca gca aca agc acc att gag cac gtc gaa tcc gtg gag cct tat 432			
Lys Ser Ala Thr Ser Thr Ile Glu His Val Glu Ser Val Glu Pro Tyr			
130	135	140	10
ttg ccg ata tac aga ata gat ccc cag ctt ttc aca aaa ggg gca tca 480			
Leu Pro Ile Tyr Arg Ile Asp Pro Gln Leu Phe Thr Lys Gly Ala Ser			
145	150	155	160
gag ctt gta aaa gca gtc gcg ctt gat aca aag cag aaa aat aaa gag 528			
Glu Leu Val Lys Ala Val Ala Leu Asp Thr Lys Gln Lys Asn Lys Glu			
165	170	175	
gtg caa tta aga ggc atc gaa caa atc gca caa ttc gca ata agc aat 576			
Val Gln Leu Arg Gly Ile Glu Gln Ile Ala Gln Phe Ala Ile Ser Asn			
180	185	190	30
gat gtg cta tat att acg gca aag cct gag tat aag gtg atg aat gat 624			
Asp Val Leu Tyr Ile Thr Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Val Met Asn Asp			
195	200	205	
gtt gcg cgt gga att gtc aaa gcg gat gtg gct cag agc agc tac ggg 672			
Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser Tyr Gly			
			40

210 215 220

ttg tat gga caa gga cag atc gta gcg gtt gcc gat aca ggg ctt gat 720
Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly Leu Asp
225 230 235 240

aca ggt cgc aat gac agt tcg atg cat gaa gcc ttc cgc ggg aaa att 768
Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly Lys Ile
245 250 255

act gca tta tat gca ttg gga cgg acg aat aat gcc aat gat acg aat 816
Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp Thr Asn
260 265 270

ggc cat ggt acg cat gtg gct ggc tcc gta tta gga aac ggc tcc act 864
Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly Ser Thr
275 280 285

aat aaa gga atg gcg cct cag gcg aat cta gtc ttc caa tct atc atg 912
Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser Ile Met
290 295 300

gat agc ggt ggg gga ctt gga gga cta cct tcg aat ctg caa acc tta 960
Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln Thr Leu
305 310 315 320

ttc agc caa gca tac agt gct ggt gcc aga att cat aca aac tcc tgg 1008
Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn Ser Trp
325 330 335

10

20

30

40

gga gca gca gtg aat ggg gct tac aca aca gat tcc aga aat gtg gat 1056
 Gly Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn Val Asp
 340 345 350

gac tat gtg cgc aaa aat gat atg acg atc ctt ttc gct gcc ggg aat 1104
 Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala Gly Asn
 355 360 365

10

gaa gga ccg aac ggc gga acc atc agt gca cca ggc aca gct aaa aat 1152
 Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala Lys Asn
 370 375 380

gca ata aca gtc gga gct acg gaa aac ctc cgc cca agc ttt ggg tct 1200
 Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe Gly Ser
 385 390 395 400

20

tat gcg gac aat atc aac cat gtg gca cag ttc tct tca cgt gga ccg 1248
 Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg Gly Pro
 405 410 415

30

aca aag gat gga cgg atc aaa ccg gat gtc atg gca ccg gga acg ttc 1296
 Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly Thr Phe
 420 425 430

ata cta tca gca aga tct tct ctt gca ccg gat tcc tcc ttc tgg gcg 1344
 Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe Trp Ala
 435 440 445

40

aac cat gac agt aaa tat gca tac atg ggt gga acg tcc atg gct aca 1392
 Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met Ala Thr
 450 455 460

ccg atc gtt gct gga aac gtg gca cag ctt cgt gag cat ttt gtg aaa 1440
 Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe Val Lys
 465 470 475 480

10

aac aga ggc atc aca cca aag cct tct cta tta aaa gcg gca ctg att 1488
 Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala Leu Ile
 485 490 495

gcc ggt gca gct gac atc ggc ctt ggc tac ccg aac ggt aac caa gga 1536
 Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn Gln Gly
 500 505 510

20

tgg gga cga gtg aca ttg gat aaa tcc ctg aac gtt gcc tat gtg aac 1584
 Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr Val Asn
 515 520 525

gag tcc agt tct cta tcc acc agc caa aaa gcg acg tac tcg ttt act 1632
 Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser Phe Thr
 530 535 540

30

gct act gcc ggc aag cct ttg aaa atc tcc ctg gta tgg tct gat gcc 1680
 Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser Asp Ala
 545 550 555 560

40

cct gcg agc aca act gct tcc gta acg ctt gtc aat gat ctg gac ctt 1728

Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu Asp Leu
565 570 575

gtc att acc gct cca aat ggc aca cag tat gta gga aat gac ttt act 1776
Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn Asp Phe Thr
580 585 590

tcg cca tac aat gat aac tgg gat ggc cgc aat aac gta gaa aat gta 1824
Ser Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu Asn Val
595 600 605

ttt att aat gca cca caa agc ggg acg tat aca att gag gta cag gct 1872
Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val Gln Ala
610 615 620

tat aac gta ccg gtt gga cca cag acc ttc tcg ttg gca att gtg aat 1920
Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala Ile Val Asn
625 630 635 640

taa	1923
-----	------

〈210〉 4

(211) 33

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

(400) 4

gctaaagggtt tctccnnnca ggggcagact ggt 33

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

ctcccaaaag gtttgnnnaa gaagcttgaa aca 33

10

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<400> 6

cacgtggaat ccgtgnnncc ttatttgccg ata 33

【図面の簡単な説明】

【図 1】 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなるプレプロ配列と 80 % 以上の相同性をもつアミノ酸配列からなるプレプロ配列を整列させた図である。 30

【図 2 a】 図 2 a は、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と 80 % 以上の相同性をもつアミノ酸配列を有するプロテアーゼを整列させた図である。

【図 2 b】 図 2 b は、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と 80 % 以上の相同性をもつアミノ酸配列を有するプロテアーゼを整列させた図であり、図 2 a に続く図である。

【 1 】

EP43 1: HXKXVFLSVLSAAALSTVALHSPFAGCAHFDLDYFCIOTTTDAGPSEOCOTCAA 60
 EP9860 1: HXKXVFLSVLSAAALSTVALHSPFAGCAHFDLDYFCIOTTTDAGPSEOCOTCAA 59
 EP9865 1: HXKXVFLSVLSAAALSTVALHSPFAGCAHFDLDYFCIOTTTDAGPSEOCOTCAA 60

 EP43 61: FLVESENVFLPGLCKLSTVFAHMLLI: OFNGPILSTKQLEKTKAKILOIIPDTAT 120
 EP9860 61: FLVESENVFLPGLCKLSTVFAHMLLI: OFNGPILSTKQLEKTKAKILOIIPDTAT 119
 EP9865 61: FLVESENVFLPGLCKLSTVFAHMLLI: OFNGPILSTKQLEKTKAKILOIIPDTAT 120

 EP43 121: FVETGQVKSATSTIEMVESVEFLPITRIPOLFTGASGLKVAVALDTKQKKEVQLR 180
 EP9860 121: FVETGQVKSATSTIEMVESVEFLPITRIPOLFTGASGLKVAVALDTKQKKEVQLR 179
 EP9865 121: FVETGQVKSATSTIEMVESVEFLPITRIPOLFTGASGLKVAVALDTKQKKEVQLR 180

 EP43 181: GIBQIAGTATSDVLYTAKFETVH 206
 EP9860 181: GIBQIAGTATSDVLYTAKFETVH 205
 EP9865 181: GIBQIAGTATSDVLYTAKFETVH 206

【 2 a 】

EP43 1: HXKXVFLSVLSAAALSTVALHSPFAGCAHFDLDYFCIOTTTDAGPSEOCOTCAA 60
 EP9860 1: HXKXVFLSVLSAAALSTVALHSPFAGCAHFDLDYFCIOTTTDAGPSEOCOTCAA 59
 EP9865 1: HXKXVFLSVLSAAALSTVALHSPFAGCAHFDLDYFCIOTTTDAGPSEOCOTCAA 60

 EP43 61: FLVESENVFLPGLCKLSTVFAHMLLI: OFNGPILSTKQLEKTKAKILOIIPDTAT 120
 A-1 61: FLVESENVFLPGLCKLSTVFAHMLLI: OFNGPILSTKQLEKTKAKILOIIPDTAT 119
 A-2 61: FLVESENVFLPGLCKLSTVFAHMLLI: OFNGPILSTKQLEKTKAKILOIIPDTAT 120

 EP43 121: FVETGQVKSATSTIEMVESVEFLPITRIPOLFTGASGLKVAVALDTKQKKEVQLR 180
 EP9860 121: FVETGQVKSATSTIEMVESVEFLPITRIPOLFTGASGLKVAVALDTKQKKEVQLR 179
 EP9865 121: FVETGQVKSATSTIEMVESVEFLPITRIPOLFTGASGLKVAVALDTKQKKEVQLR 180

 EP43 181: GIBQIAGTATSDVLYTAKFETVH 206
 A-1 181: GIBQIAGTATSDVLYTAKFETVH 205
 A-2 181: GIBQIAGTATSDVLYTAKFETVH 206

 EP43 121: AGARITHTNGAPVHCATTDSRVDVTVKNGHTILFAAGHCPNGCTISAPCTAKNAI 180
 EP9860 121: AGARITHTNGAPVHCATTDSRVDVTVKNGHTILFAAGHCPNGCTISAPCTAKNAI 180
 EP9865 121: AGARITHTNGAPVHCATTDSRVDVTVKNGHTILFAAGHCPNGCTISAPCTAKNAI 180
 E-1 120: AGARITHTNGAPVHCATTDSRVDVTVKNGHTILFAAGHCPNGCTISAPCTAKNAI 179
 Y6 120: AGARITHTNGAPVHCATTDSRVDVTVKNGHTILFAAGHCPNGCTISAPCTAKNAI 179
 SD-521 120: AGARITHTNGAPVHCATTDSRVDVTVKNGHTILFAAGHCPNGCTISAPCTAKNAI 179
 A-1 121: AGARITHTNGAPVHCATTDSRVDVTVKNGHTILFAAGHCPNGCTISAPCTAKNAI 180
 A-2 120: AGARITHTNGAPVHCATTDSRVDVTVKNGHTILFAAGHCPNGCTISAPCTAKNAI 179

 EP43 181: TVGATEHLFPFSGYADRIHNVADQFSEKPTDGRIRFDVNAPOCTILSARESLAPDESF 246
 EP9860 181: TVGATEHLFPFSGYADRIHNVADQFSEKPTDGRIRFDVNAPOCTILSARESLAPDESF 246
 EP9865 181: TVGATEHLFPFSGYADRIHNVADQFSEKPTDGRIRFDVNAPOCTILSARESLAPDESF 246
 E-1 180: TVGATEHLFPFSGYADRIHNVADQFSEKPTDGRIRFDVNAPOCTILSARESLAPDESF 239
 Y6 180: TVGATEHLFPFSGYADRIHNVADQFSEKPTDGRIRFDVNAPOCTILSARESLAPDESF 239
 SD-521 180: TVGATEHLFPFSGYADRIHNVADQFSEKPTDGRIRFDVNAPOCTILSARESLAPDESF 239
 A-1 181: TVGATEHLFPFSGYADRIHNVADQFSEKPTDGRIRFDVNAPOCTILSARESLAPDESF 240
 A-2 180: TVGATEHLFPFSGYADRIHNVADQFSEKPTDGRIRFDVNAPOCTILSARESLAPDESF 239

 EP43 241: HANDESKATNGCTSHATPIVAGVAGLREHVFHRCITPPELILKALAGAADVCLGT 300
 EP9860 241: HANDESKATNGCTSHATPIVAGVAGLREHVFHRCITPPELILKALAGAADVCLGT 300
 EP9865 241: HANDESKATNGCTSHATPIVAGVAGLREHVFHRCITPPELILKALAGAADVCLGT 300
 E-1 240: HANDESKATNGCTSHATPIVAGVAGLREHVFHRCITPPELILKALAGAADVCLGT 299
 Y6 240: HANDESKATNGCTSHATPIVAGVAGLREHVFHRCITPPELILKALAGAADVCLGT 299
 SD-521 240: HANDESKATNGCTSHATPIVAGVAGLREHVFHRCITPPELILKALAGAADVCLGT 299
 A-1 241: HANDESKATNGCTSHATPIVAGVAGLREHVFHRCITPPELILKALAGAADVCLGT 300
 A-2 240: HANDESKATNGCTSHATPIVAGVAGLREHVFHRCITPPELILKALAGAADVCLGT 299

【 2 b 】

EP43 301: PHGQDQGVFLDRLSVAFVHESSELSTGQATTSFTATAGKFLRISLVMSDAPASTTA 360
 EP9860 301: PHGQDQGVFLDRLSVAFVHESSELSTGQATTSFTATAGKFLRISLVMSDAPASTTA 360
 EP9865 301: PHGQDQGVFLDRLSVAFVHESSELSTGQATTSFTATAGKFLRISLVMSDAPASTTA 360
 E-1 300: PHGQDQGVFLDRLSVAFVHESSELSTGQATTSFTATAGKFLRISLVMSDAPASTTA 359
 Y6 300: PHGQDQGVFLDRLSVAFVHESSELSTGQATTSFTATAGKFLRISLVMSDAPASTTA 359
 SD-521 300: PHGQDQGVFLDRLSVAFVHESSELSTGQATTSFTATAGKFLRISLVMSDAPASTTA 360
 A-1 301: PHGQDQGVFLDRLSVAFVHESSELSTGQATTSFTATAGKFLRISLVMSDAPASTTA 360
 A-2 300: PHGQDQGVFLDRLSVAFVHESSELSTGQATTSFTATAGKFLRISLVMSDAPASTTA 359

 EP43 361: EVTLVHDLVITAPNGCTVQNDFTSPHNGVCHHNVHVFINAPQSGCTTIEVQATH 420
 EP9860 361: EVTLVHDLVITAPNGCTVQNDFTSPHNGVCHHNVHVFINAPQSGCTTIEVQATH 419
 EP9865 361: EVTLVHDLVITAPNGCTVQNDFTSPHNGVCHHNVHVFINAPQSGCTTIEVQATH 420
 E-1 360: EVTLVHDLVITAPNGCTVQNDFTSPHNGVCHHNVHVFINAPQSGCTTIEVQATH 419
 Y6 360: EVTLVHDLVITAPNGCTVQNDFTSPHNGVCHHNVHVFINAPQSGCTTIEVQATH 419
 SD-521 360: EVTLVHDLVITAPNGCTVQNDFTSPHNGVCHHNVHVFINAPQSGCTTIEVQATH 419
 A-1 361: EVTLVHDLVITAPNGCTVQNDFTSPHNGVCHHNVHVFINAPQSGCTTIEVQATH 420
 A-2 360: EVTLVHDLVITAPNGCTVQNDFTSPHNGVCHHNVHVFINAPQSGCTTIEVQATH 419

 EP43 421: VVFCQPFSLAIVH 436
 EP9860 421: VVFCQPFSLAIVH 436
 EP9865 421: VVFCQPFSLAIVH 436
 E-1 420: VVFCQPFSLAIVH 433
 Y6 420: VVFCQPFSLAIVH 433
 SD-521 420: VVFCQPFSLAIVH 433
 A-1 421: VVFCQPFSLAIVH 436
 A-2 420: VVFCQPFSLAIVH 433

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁷	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/56	
C 1 2 N 9/56	C 1 2 N 5/00	A

(74)代理人 100117156

弁理士 村田 正樹

(74)代理人 100111028

弁理士 山本 博人

(72)発明者 佐藤 剛

栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 奥田 光美

栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 瀧村 靖

栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 住友 伸行

栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 小林 徹

栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

F ターム(参考) 4B024 AA17 BA14 CA04 CA06 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12 EA04

FA17 GA11 HA03

4B050 CC03 CC04 DD02 LL04

4B065 AA01X AA15Y AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA33 CA57

4H003 AB03 AB19 AC08 BA12 BA19 DA01 DA05 DA17 DA19 EA12

EA15 EA16 EA28 EB30 EB36 EC02 ED02 FA04